ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

268 357

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.[4]
G 01 N 27/52

(21) PV 476 - 88.N
(22) Přihlášeno 11 03 86

(40) Zveřejněno 14 08 89
(45) Vydáno 31 08 90

(75)
Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc.ing. CSc.,
OOLEŽAL BOHUSLAV doc.ing. CSc.,
PAVLÍČEK ZDENĚK ing. CSc.,
VOLF RADKO ing. CSc.,
ŠŤASTNÝ MILOSLAV ing. CSc., PRAHA
NEPOŽITEK JIŘÍ ing. CSc., PROSTĚJOV
GILAR OLDŘICH ing. CSc., ZDIBY

(54) Způsob přípravy elektrochemického senzoru na stanovení alkoholů

(57) Řešení se týká způsobu přípravy enzymového elektrochemického senzoru na stanovení alkoholů. Senzor je tvořen detektorem kyslíku, na němž je fixována vrstva nebo membrána obsahující polysacharid. Enzym alkoholoxidáza se na tuto vrstvu imobilizuje reakcí svých aminoskupin s aldehydovými skupinami vytvořenými jodistanovou oxidací vicinálních diolů cukerných jednotek přítomného polysacharidu, alternativně se imobilizuje společně s rozpustným oligosacharidem nebo polysacharidem. Enzymový elektrochemický senzor připravený popsaným způsobem umožňuje rychle a spolehlivě měřit koncentraci alkoholů v technologických vzorcích bez předchozí úpravy analyzované směsi.

CS 268357 B1

Vynález se týká způsobu přípravy enzymového elektrochemického senzoru na stanovení alkoholů na principu enzymové reakce oxidace katalyzované imobilizovanou alkoholoxidázou v kombinaci s elektrochemickou detekcí ekvivalentní spotřeby kyslíku.

Stanovení primárních alkoholů, především methanolu a ethanolu, ale i například n-propanolu, n-butanolu a allylalkoholu, je velmi důležité v řadě technologií chemického průmyslu a zvláště v moderních technologiích. V mnoha případech je významné stanovení těchto alkoholů i v surovinách nebo produktech potravinářského průmyslu. Stanovení ethanolu je zvlášť potřebné a velmi časté i v soudních a klinických toxikologických laboratořích, především z důvodu legislativní kontroly při zajišťování bezpečnosti dopravy.

Z uvedených důvodů byla pro stanovení titulních alkoholů vypracována řada postupů chemických, většinou s fotometrickou detekcí, i fyzikálně chemických, z nichž největšího uplatnění doznala plynová chromatografie.

V souvislosti s rozvojem enzymových analytických postupů vyznačujících se vysokou citlivostí, jednoduchostí a specifitou danou vlastní podstatou enzymové katalýzy, byla věnována pozornost též enzymovému stanovení především ethanolu. Při tomto stanovení se využívá katalytického účinku alkoholdehydrogenázy (E.C.1.1.1.1.), přičemž množství oxidovaného ethylalkoholu je nejběžněji sledováno fotometricky na základě ekvivalentní tvorby redukované formy koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (NADH).

K enzymovému stanovení ethanolu je možno použít též alkoholoxidázu, která katalyzuje oxidaci alkoholu přímo kyslíkem, aniž by byla nutná přítomnost koenzymu NAD^+. Substrátová specifita alkoholoxidázy je však širší, zahrnuje i některé další primární alifatické alkoholy, i když jejich relativní rychlost oxidace je ve srovnání s ethanolem výrazně nižší. Této skutečnosti může být na jedné straně využito pro stanovení těchto jednotlivých alkoholů, na druhé straně však může být v některých případech zkreslen výsledek analýzy přítomností kontaminujících alkoholů. Z tohoto hlediska je největší nebezpečí ovlivnění výsledků analýzy přítomností ethanolu jako kontaminující složky při stanovení jiných alkoholů. Naopak při stanovení ethanolu zvláště ve fyziologických tekutinách, nebo jiných vzorcích fyziologického původu, toto nebezpečí prakticky nepřichází v úvahu.

Průběh enzymové reakce je možno sledovat přímo na základě tvorby nebo spotřeby určité substance, nebo pomocí následných chemických nebo enzymových reakcí vzniklých reakčních produktů. Vedle velmi často používané fotometrie má velký význam spojení enzymové reakce s elektrochemickými čidly detekujícími substráty, produkty nebo jiné látky ovlivňující průběh enzymové reakce.

Použití volných enzymů je spojeno v některých případech s technickými nebo ekonomickými problémy jejich získávání. Z tohoto důvodu je velmi atraktivní jejich fixace v blízkosti elektrochemického čidla, čímž je vytvořen senzor - enzymová elektroda, opakovaně použitelný při stovkách analýz bez jakékoliv spotřeby chemikálií, vyjma v některých případech pouze pufru.

Pro stanovení alkoholů byla vypracována příprava enzymové elektrody spočívající v imobilizaci enzymu alkoholoxidázy ve spojení buď s elektrochemickou detekcí vznikajícího peroxidu vodíku, nebo s elektrochemickým stanovením spotřeby kyslíku kyslíkovým článkem Clarkova typu.

S ohledem na stabilitu vytvoření enzymové elektrody je výhodná imobilizace enzymu kovalentní vazbou. Pro přípravu enzymových elektrod je nejčastěji používanou technikou imobilizace prokřížení molekul pomocí glutaraldehydu, v některých případech v kombinaci s jinými enzymy či přidanou bílkovinou.

Tento problém řeší způsob přípravy elektrochemického senzoru na stanovení alkoholu podle vynálezu, jehož podstatou je, že na vrstvu nebo membránu tvořenou materiálem

obsahujícím polysacharid se alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých aminoskupin s aldehydovými skupinami tvořenými jodistanovou oxidací vicinálních diolů cukerných jednotek přítomného polysacharidu. Alternativně se enzym alkoholoxidáza imobilizuje na vrstvu nebo membránu společně s rozpustným oligosacharidem nebo polysacharidem.

Výhodou enzymového elektrochemického senzoru vytvořeného způsobem podle vynálezu je zvýšení jeho stability. Pro některé aplikace senzoru s ohledem na další zvýšení jeho stability je výhodné překrýt vrstvu s imobilizovaným enzymem další membránou propustnou pouze pro nízkomolekulární látky.

Enzymový elektrochemický senzor na stanovení alkoholů připravený podle vynálezu umožňuje rychle a spolehlivě měřit koncentraci alkoholů v technologických vzorcích bez předchozí úpravy analyzované směsi, zvláště výhodný je pro stanovení ethalalkoholu ve fyziologických tekutinách, především plazmě a v dechu intoxikovaných probantů v rozsahu desetin až stovek promile.

Předmět vynálezu je dokumentován na následujících příkladech, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Celulózový terčík byl ponořen do roztoku jodistanu sodného (0,1 mol.dm^{-3}), po dvou hodinách stání za občasného promíchání byl vyjmut a promyt destilovanou vodou. Na takto aktivovaný terčík obsahující aldehydové skupiny bylo aplikováno 150 µl alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm^3 fosfátovém pufru pH 7,5. Po šesti hodinách byl terčík s navázanou alkoholoxidázou fixován na detektor kyslíku a dále překryt membránou z acetátu propouštějící pouze nízkomolekulární látky. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven ethylalkohol na základě úbytku kyslíku v reakční směsi s lineární odezvou v rozsahu 5.10^{-7} až 5.10^{-4} molů ethylalkoholu v dm^3.

Příklad 2

Na celulózový terčík aktivovaný podle příkladu 1 byly aplikovány 2 µl kyseliny octové (0,5 ml.dm^{-3}), 1 µl cyklohexylisokyanidu a 150 µl alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm^3 fosfátovém pufru pH 7,5. Po šesti hodinách byl terčík s navázanou alkoholoxidázou důkladně promyt 0,1 mol/dm^3 fosfátovým pufrem pH 7,5 a potom byl fixován na detektor kyslíku. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven n-butanol s lineární odezvou v koncentračním rozsahu 10^{-6} až 10^{-3} molů v dm^3.

Příklad 3

Oxidace dextranu

Ke 2 g dextranu bylo přidáno 50 ml 0,25 mol/dm^3 jodistanu sodného ve 0,05 mol/dm^3 fosfátovém pufru pH 6. Po třech hodinách míchání za nepřístupu světla při 20 °C byla reakční směs dialyzována proti vodě při 4 °C po dobu 48 hodin.

Aktivace skleněné porézní vrstvy

Tenký terčík ze sintrového skla byl v 10ti procentním gama-aminopropyltriethoxysilanu v toluenu zahříván k refluxu po dobu dvanácti hodin. Potom byl promyt toluenem a vysušen.

Imobilizace alkoholoxidázy

Směs alkoholoxidázy a aktivovaného dextranu v poměru 1 : 2 (obj. jed.) byla aplikována na terčík z porézního skla modifikovaného gama-aminopropyltriethoxysilanem. Terčík byl fixován na detektor kyslíku a dále překryt membránou z acetátu celulosy propouštějící pouze nízkomolekulární látky. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven methylalkohol ve vodných roztocích s lineární odezvou v rozsahu koncentrací 5.10^{-7} až 4.10^{-4} mol.dm^{-3}.

Příklad 4

Ke směsi alkoholoxidázy a aktivovaného dextranu připraveného podle příkladu 3 byl přidán bezprostředně před aplikací na modifikované porézní sklo obsahující amino-

skupiny cyklohexylisokyanid v poměru 150 : 300 : 1. Po šesti hodinách byl terčík s imobilizovanou alkoholoxidázou a dextranem promyt 0,1 mol/dm^3 fosfátovým pufrem pH 7,5 a potom byl fixován na detektor kysliku a překryt membránou z acetátu celulózy. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven ethylalkohol s lineární odezvou v rozsahu 5. 10^{-7} až 5. 10^{-4} mol . dm^{-3}.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy enzymového elektrochemického senzoru na stanovení alkoholů, který obsahuje detektor kysliku, na němž je fixována vrstva nebo membrána tvořená materiálem obsahujícím polysacharid s imobilizovaným enzymem alkoholoxidázou, vyznačující se tím, že na vrstvu nebo membránu se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých aminoskupin s aldehydovými skupinami vytvořenými jodistanovou oxidací vicinálních diolů cukerných jednotek přítomného polysacharidu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že na vrstvě nebo membráně se enzym alkoholoxidáza imobilizuje společně s rozpustným oligosacharidem nebo polysacharidem.